

Thesis Title	Development of Chromatographic Techniques for Quantitative Analysis of Amphotericin B and Nystatin
Author	Miss Jirattikorn Vong-onta
Degree	Master of Science (Pharmaceutical Sciences)
Thesis Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Boonsom Liawruangrath Advisor Assoc. Prof. Dr. Saisunee Liawruangrath Co-advisor

ABSTRACT

Two simple, selective, linear, precise and accurate reversed phase ion-pair chromatographic (RP-IPC) methods were developed and validated for rapid assay of amphotericin B and nystatin in pharmaceutical preparations.

Amphotericin B was determined by the developed RP-IPC method, using a XTerra C18 column (4.6 mm × 150 mm, 5 μ m). The mobile phase consisted of 0.1 mM CTAB (50 mM phosphate buffer pH 3: MeOH) (30 : 70 v/v) at flow rate of 1.0 ml min⁻¹. The detection wavelength was 408 nm. The retention times of amphotericin B was 5.5 min. The calibration graph was linear over the ranged of 0.84 – 504.13 μ g ml⁻¹. The detection and quantitation limits were found to be 0.25 μ g ml⁻¹ and 0.84 μ g ml⁻¹, respectively. The within-day precision were 1.91% – 3.60% for Sample A and 1.95% – 4.08% for Sample B. The between day precisions were 1.96% – 4.34% for Sample A and and 1.97% – 4.75%. for Sample B. The method was successfully applied to the determination of amphotericin B in pharmaceutical products.

Nystatin in pharmaceutical formulations was also determined by the RP-IPC method. The mobile phase was 0.05 mM CTAB (50 mM phosphate buffer pH 4 :

MeOH) (35 : 65 v/v) with flow rate of 1.0 ml min⁻¹. A Xbridge C18 column (4.6 mm x 150 mm, 5.0 µm) at 25 °C was used as stationary phase and UV detection at 305 nm. Response was linearly dependent on concentration between 1.4 – 1,000 µg ml⁻¹ with a limit of detection of 0.4 µg ml⁻¹. The retention time was 7.4 min. The relative standard deviations of within-day precision were 1.69% – 2.39% for Sample G and 1.47% – 5.63% for Sample T. The between day precision at three known concentration levels for three days were 2.49% – 3.71% for Sample G and 2.11% – 5.08% for Sample T. The recoveries were greater than 90% of both samples. This method was applied to the determination of nystatin in oral suspension and vaginal tablet dosage forms. No interference from excipients and degrade product was encountered.

A rapid and simple high performance thin layer chromatographic method (HPTLC) was also developed for the determination of amphotericin B in the same samples. The method was performed in the twin trough chamber with MeOH : 2% acetic acid (98 : 2.5 v/v) as a mobile phase, operated at ambient temperature. The sample solutions were applied on a HPTLC silica gel 60 F₂₅₄ plate. The spot areas were quantified by densitometry at 405 nm. Linear calibration curve was obtained over the range of 42.01 – 336.09 µg ml⁻¹ ($r^2 > 0.99$). The mean percentage recoveries of 42.01, 84.02 and 168.04 µg ml⁻¹ ($n = 10$) of amphotericin B for Sample A and Sample B were found to be 98.76%, 97.42%, 99.28% for Sample A and 95.81%, 100.48%, 99.76% for Sample B, respectively. The proposed HPTLC method can be used for routine analysis of amphotericin B in bulk drug and its formulations.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การพัฒนาเทคนิคโครมาโทกราฟีสำหรับหาปริมาณ
แอมโฟเทอรีซิน บี และนิสเตติน

ผู้เขียน

นางสาวจิรัฐติกร วงศ์อ่อนตา

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เภสัชกรรม)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ.ดร. นฤสม เหลือเวียงรัตน์

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

รศ.ดร. สายสุนีย์ เหลือเวียงรัตน์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ได้พัฒนาวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวแบบไอออนแพร์ (อาร์พีไอพีซี) สองวิธี ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย, มีความจำเพาะ, ให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง, มีความแม่นยำ และความถูกต้อง สำหรับหาปริมาณแอมโฟเทอรีซินบีและนิสเตติน

ในการหาปริมาณแอมโฟเทอรีซิน บี โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบไอออนแพร์ที่ได้พัฒนาขึ้น โดยใช้คอลัมน์ชนิด XTerra ซี18 (4.6 มิลลิเมตร × 150 มิลลิเมตร, 5 ไมครอน) เฟสเคลื่อนที่แบบไอออนแพร์คือ 0.1 มิลลิโมลาร์ ซีทีเอบีในส่วนผสมของ 50 มิลลิโมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 3 และเมทานอล อัตราส่วน 30 ต่อ 70 โดยปริมาตร อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิเมตรต่อนาที ตรวจวัดด้วยเครื่องยูวีที่มีความยาวคลื่น 408 นาโนเมตร ระยะเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์เท่ากับ 5.5 นาที ได้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงในช่วง 0.84 – 504.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร โดยค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดและค่าขีดจำกัดของการหาปริมาณเท่ากับ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร และ 0.84 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตรตามลำดับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ในการหาค่าความแม่นยำของวิธีภายในวันเดียวกันอยู่ในช่วง 1.91% – 3.60% สำหรับตัวอย่างเอ และ 1.95% – 4.08% สำหรับตัวอย่างบี ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ในการหาค่าความแม่นยำของวิธีระหว่างวันอยู่ในช่วง 1.96% – 4.34% สำหรับตัวอย่างเอ และ 1.97% – 4.75% สำหรับตัวอย่างบี

พบว่าวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้ในการหาปริมาณแอมโฟเทอรีซินบีในผลิตภัณฑ์ยาได้เป็นอย่างดี

ในการหาปริมาณนีสเตดินในผลิตภัณฑ์ยาโดยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวแบบไอออนแพร์ โดยใช้เฟสเคลื่อนที่แบบไอออนแพร์คือ 0.05 มิลลิโมลาร์ ซีทีเอบีในส่วนผสมของ 50 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 4 และเมทานอล อัตราส่วน 35 ต่อ 65 โดยปริมาตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที และเฟสคงที่ที่ใช้คือ คอลัมน์ Xbridge ซี18 (4.6 มิลลิลิตร × 150 มิลลิลิตร, 5 ไมครอน) ควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 25 องศาเซลเซียส ตรวจวัดด้วยเครื่องยูวีที่ความยาวคลื่น 305 นาโนเมตร สัญญาณการตรวจวัดที่ได้ให้ความเป็นเส้นตรงในช่วง 1.4 – 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยให้ค่าจีค่าจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดเท่ากับ 0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ระยะเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์เท่ากับ 7.4 นาที ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ในการหาค่าความแม่นยำของวิธีภายในวันเดียวกันอยู่ในช่วง 1.69% – 2.39% สำหรับตัวอย่างจี และ 1.47% – 5.63% สำหรับตัวอย่างที ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ในการหาค่าความแม่นยำของวิธีระหว่างวันอยู่ในช่วง 2.49% – 3.71% สำหรับตัวอย่างจี และ 2.11% – 5.08% สำหรับตัวอย่างที และค่าร้อยละของการกลับคืนเฉลี่ยของนีสเตดินที่เติมลงไปในตัวอย่าง ให้ค่าการกลับคืนมากกว่าร้อยละ 90 ทั้ง 2 ตัวอย่าง ได้ใช้วิธีนี้ในการหาปริมาณนีสเตดินในผลิตภัณฑ์ยาในรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอนและในรูปแบบยาเหน็บช่องคลอด พบว่าได้ผลเป็นอย่างดีโดยปราศจากการรบกวนจากองค์ประกอบอื่น ๆ ในตำรับ

ได้พัฒนาวิธีโครมาโทกราฟีผิวบางสมรรถนะสูงที่รวดเร็วกว่าและง่าย เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณแอมโฟเทอรีซินบีในผลิตภัณฑ์ยาดังกล่าว (เอชพีทีแอลซี) โดยนำสารละลายตัวอย่างแยกบนแผ่นซิลิกาเจล ใน twin trough chamber โดยมีเฟสเคลื่อนที่เป็นส่วนผสมของเมทานอลต่อ 2 เปอร์เซนต์ อะซิติก เอซิด อัตราส่วน 98 ต่อ 2.5 โดยปริมาตร โดยทำการแยกสารที่อุณหภูมิปกติ จากนั้นทำการตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ได้กราฟเส้นตรงในช่วง 42.01 – 336.09 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($r^2 > 0.99$) ค่าร้อยละของการกลับคืนเฉลี่ยของแอมโฟเทอรีซินบีที่เติมลงไปในตัวอย่างทีระดับความเข้มข้นที่ 42.01, 84.02 และ 168.04 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($n = 10$) ในตัวอย่างเอ และตัวอย่างบี พบว่าได้ค่าร้อยละของการกลับคืนเฉลี่ยเท่ากับ 98.76%, 97.42%, 99.28% สำหรับตัวอย่างเอ และ 95.81%, 100.48%, 99.76% สำหรับตัวอย่างบี ตามลำดับ วิธีเอชพีทีแอลซีที่นำเสนอนี้สามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ในงานประจำสำหรับหาปริมาณแอมโฟเทอรีซินบีในรูปแบบวัตถุขบและรูปแบบผลิตภัณฑ์ยาได้